

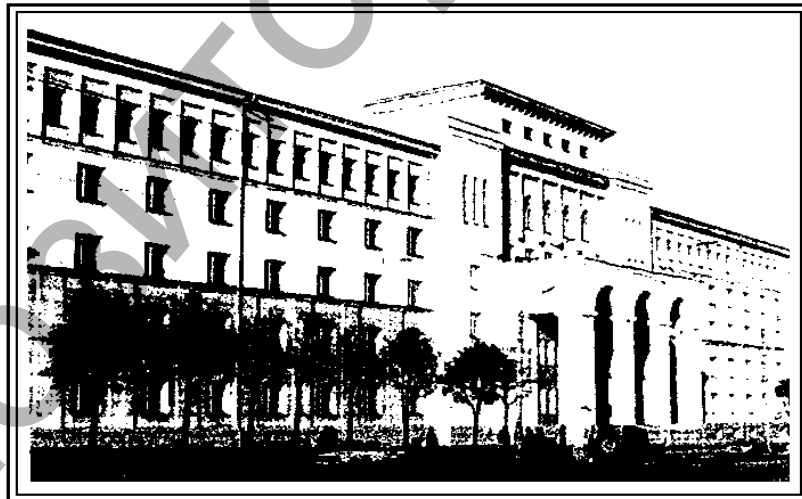
ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 18, №3*

2019



## МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.831.31-005.4.-092.913:618.33

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ У КРЫС С СУБТОТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВВЕДЕНИИ L-NAME И L-АРГИНИНА**

© Бонь Е.И., Максимович Н. Е., Зиматкин С.М., Валько Н.А., Кот В.Н., Неделько Э.А.

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь, 230009, ул. Горького, 80**Резюме*

**Цель.** Изучение гистологических изменений в теменной коре головного мозга крыс при субтотальной церебральной ишемии на фоне сочетанного введения L-NAME, а также его совместного применения с L-Аргинином.

**Методика.** Эксперименты выполнены на 24 самках беспородных белых крыс с начальной массой 210±20 г. Субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) моделировали путем перевязки общих сонных артерий. Крысам группы СИГМ+L-NAME до перевязки общих сонных артерий вводили неселективный ингибитор NO-синтазы – L-NAME. Крысам группы СИГМ+L-NAME+L-Аргинин дополнительно вводили L-Аргинин одновременно с L-NAME. Животных декапитировали после 60-минутной ишемии.

**Результаты.** При субтотальной церебральной ишемии в теменной коре происходят существенные морфологические изменения – снижение размеров и деформация перикарионов нейронов и появление большого количества гиперхромных нейронов. На фоне введения L-NAME нарушения более выраженными. При дополнительном введении L-Аргинина негативные изменения, вызванные L-NAME, корригировались.

**Заключение.** Таким образом, введение неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME усугубляло гистологические нарушения нейронов теменной коры при субтотальной церебральной ишемии. Применение L-Аргинина оказывало корригирующее воздействие, обусловленное как его непосредственным антигипоксическим влиянием, так и опосредованным, за счёт синтеза NO.

**Ключевые слова:** церебральная ишемия, нейроны, L-NAME, L-Аргинин

**HISTOLOGICAL CHANGES OF THE NEURONS OF THE RATS PARIETAL CORTEX WITH SUBTOTAL CEREBRAL ISCHEMIA WITH COMBINED INTRODUCTION L-NAME AND L-ARGININE**

Bon' E.I., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M., Valko N.A., Kot V.N., Nedelko E.A.

*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic Belarus**Abstract*

**Objective.** To study the histological changes in the parietal cortex of the rat brain during subtotal cerebral ischemia on the background of the combined administration of L-NAME, as well as its combined use with L-Arginine.

**Methods.** The experiments were performed on 24 female outbred white rats with an initial weight of 210±20 g. Subtotal cerebral ischemia (SCI) was modeled by ligation of the common carotid arteries. Prior to the ligation of the common carotid arteries the rats of the SCI + L-NAME group were injected with a non-selective inhibitor of NO-synthase – L-NAME. The rats of the SCI + L-NAME + L-Arginine group were additionally injected with L-Arginine simultaneously with L-NAME. The animals were decapitated after 60 minutes of ischemia.

**Results.** In subtotal cerebral ischemia, significant morphological changes occur in the parietal cortex – reduction in size and deformation of the neurons perikaryons and the appearance of a large number of hyperchromic neurons. On the background of the introduction of L-NAME the violations were more pronounced. With the additional introduction of L-Arginine, the negative changes caused by L-NAME were corrected.

**Conclusion.** Thus, the introduction of the non-selective inhibitor of NO-synthase L-NAME aggravated the histological disorders of the neurons of the parietal cortex during subtotal cerebral ischemia. The use of L-Arginine has a corrective effect, both due to its direct antihypoxic effect, and indirectly, due to the synthesis of NO.

**Keywords:** cerebral ischemia, neurons, L-NAME + L-Arginine

## Введение

Ишемические повреждения головного мозга – по-прежнему одна из лидирующих причин заболеваемости, инвалидности и смертности в Беларуси, что предполагает необходимость проведения дальнейших исследований в этом направлении [9]. Особая роль в патогенезе ишемии оксиду азота, NO который образуется в головном мозге при участии нейрональных и экстранейрональных источников, образуя «нитергическую систему» головного мозга [7, 8, 14]. Образование NO происходит из аминокислоты L-Аргинин, являющейся субстратом NO-синтазы (NOS). Ряд исследований ишемических повреждений головного мозга свидетельствует о том, что оксид азота может оказывать как защитное, так и повреждающее действие. Благоприятные NO эффекты (вазодилатация, противовоспалительное, антиатерогенное, антитромбогенное действие и др.) реализуются через эндотелиальную изоформу NOS, а негативные – посредством избыточной активации нейрональной и индуцибельной [6, 7, 9].

Неселективный ингибитор NOS этиловый эфир Nω-нитро-L-аргинин (Nω-nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME)) угнетает все изоформы фермента, в том числе эндотелиальную, что приводит к уменьшению антигипоксической резистентности, увеличению агрегации тромбоцитов и снижению мозгового кровотока [6].

Одной из перспективных аминокислот-нейропротекторов, является L-Аргинин. L-Аргинин обладает антигипоксическим, противоболевым, противовоспалительным, антиатерогенным и антиагрегатными свойствами. Большинство эффектов, вызываемых данной аминокислотой, связано с ее способностью увеличивать образование NO, выступая в качестве источника для его образования. Показано, что использование L-Аргинина уменьшает размеры инфаркта, снижает тонус сосудов и вызывает гипотензивный эффект, предупреждает и корригирует ишемические и реперфузионные повреждения головного мозга и других органов [6-9].

Эффекты L-NAME и L-Аргинина показаны в экспериментах с помощью биохимических методов и функциональных проб, однако количественного морфологического изучения последствий сочетанного введения L-NAME и L-Аргинина в условиях субтотальной церебральной ишемии не проводилось.

Целью работы явилось изучение гистологических изменений в теменной коре головного мозга крыс при субтотальной церебральной ишемии на фоне сочетанного введения L-NAME, а также его совместного применения с L-Аргинином.

## Методика

Эксперименты проведены на 24 самках беспородных белых крыс массой  $210 \pm 20$  г. В ходе исследования соблюдались все требования Директивы Европейского Парламента и Совета №2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использующихся для научных целей [12]. Животных содержали в проветриваемом помещении при температуре  $22^\circ\text{C}$  при достаточном освещении. Крысы находились на стандартном рационе вивария, им был обеспечен свободный доступ к корму и воде. В одной клетке находилось не более пяти особей. Использование крыс в качестве экспериментальных животных обусловлено сходством ангиоархитектоники и морфологии коры головного мозга у крыс и человека [3, 4].

Контрольную группу составили ложнооперированные крысы, которым производился разрез кожи и внутривенно вводили изотонический раствор NaCl. Субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг). Крысам группы СИГМ+L-NAME до перевязки общих сонных артерий вводили неселективный ингибитор NOS – L-NAME в дозе 5мг/кг. Крысам группы СИГМ+L-NAME+L-Аргинин дополнительно вводили L-Аргинин в дозе 200 мг/кг одновременно с L-NAME. Животных декапитировали после 60-минутной ишемии.

После декапитации производили извлечение головного мозга, стандартно выделенные участки коры больших полушарий, содержащие и теменную кору, фиксировали в жидкости Карнуа. На микротоме готовили серийные парафиновые срезы и окрашивали их 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Локализацию теменной коры в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [13]. В препарате, приготовленном из материала от одного животного, оценивали не менее 30 нейронов, а в каждой экспериментальной группе – 150 нейронов пятого слоя теменной коры, что обеспечивало достаточный объем выборки.

Для статистического анализа полученных в эксперименте данных использовали методы непараметрической статистики (программа Statistica 10.0 для Windows, StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me), границы процентилей (от 25 до 75). Количественные результаты представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – нижняя граница нижнего квартиля; UQ – верхняя граница верхнего квартиля. Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях  $p < 0,05$  (тест Краскелла-Уоллиса с поправкой Бонферони) [1].

## Результаты исследования

В условиях субтотальной церебральной ишемии наблюдалось значительное снижение размеров перикарионов нейронов, увеличивалась их вытянутость и уменьшалась округлость. В наибольшей степени форм-фактор изменялся при введении L-NAME, однако дополнительное введение L-Аргинина корригировало эффект неселективного ингибитора NOS (табл. 1).

Таблица 1. Размеры и форма перикарионов нейронов

Группы животных	Показатели морфометрии		
	площадь, мкм <sup>2</sup>	фактор элонгации, ед.	форм-фактор, ед.
Контроль	144,6(130,5;153,8)	1,2(1,1;1,2)	0,9(0,9;0,9)
СИГМ	69(67;73,6)*	1,5(1,4;1,5)*	0,8(0,8;0,85)*
СИГМ+L-NAME	61,5(58,8;63,6)*	1,4(1,4;1,5)*	0,67(0,6;0,7) <sup>+</sup>
СИГМ+L-NAME+L-Аргинин	83,5(39,3;99,8)*	1,5(1,4;1,65)*	0,76(0,7;0,8) <sup>#</sup>

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, + –  $p < 0,05$  по сравнению с СИГМ, # –  $p < 0,05$  по сравнению с СИГМ+L-NAME, где СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга, L-NAME – Nω-нитро-L-аргинин

В условиях субтотальной церебральной ишемии в теменной коре наблюдалось снижение количества нормохромных нейронов и увеличение количество гиперхромных, гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). У животных группы (СИГМ+L-NAME) количество гиперхромных несморщенных нейронов уменьшалось, но при этом происходило увеличение доли гиперхромных сморщенных нейронов ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой СИГМ. При сочетанном введении L-NAME и L-Аргинина соотношение разных по степени хромотофилии нейронов не отличалось от такового в группе СИГМ ( $p > 0,05$ ) (рис. 1).

Таблица 2. Типы нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы

Группы животных	Типы нейроны			
	нормохромные	гиперхромные	гиперхромные сморщенные	клетки-тени
Контроль	3283(3216;3283)	201(201;268)	134(67;134)	134(0;134)
СИГМ	2043(1943;2077)*	938(804;938)*	670(670;670)*	335(269;402)*
СИГМ+L-NAME	1976,5(1943;2010)*	603(536;670) <sup>+</sup>	938(938;938) <sup>+</sup>	335(268;402)*
СИГМ+L-NAME+L-Аргинин	2043(1941;2143)*	941(941;941) <sup>#</sup>	672(538;672) <sup>#</sup>	404(269;404)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, + –  $p < 0,05$  по сравнению с СИГМ, # –  $p < 0,05$  по сравнению с СИГМ+L-NAME, где СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга, L-NAME – Nω-нитро-L-аргинин

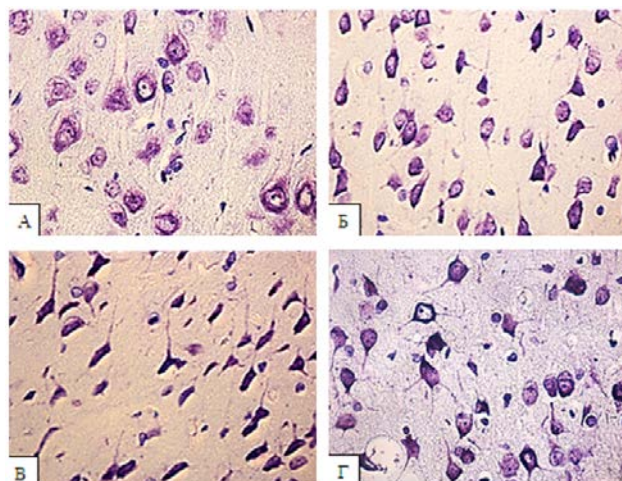


Рис. 1. Нейроны пятого слоя теменной коры. А – контроль (преобладание нормохромных нейронов). Б – ИГМ (преобладание гиперхромных нейронов). В – ИГМ+L-NAME (преобладание гиперхромных сморщенных нейронов), Г – L-NAME+L-Аргинин+СИГМ (преобладание гиперхромных нейронов). Цифровая микрофотография. Окраска по Нисслю

При субтотальной церебральной ишемии в теменной коре происходят существенные морфологические изменения – снижение размеров и деформация перикарионов нейронов, появление большого количества гиперхромных нейронов, которые часто расцениваются в качестве маркеров ишемии [2, 5, 11]. Интенсивная окраска их цитоплазмы обусловлена существенным преобладанием доли свободных рибосом, образующих обширные скопления. Фиксация рибосом к мембранам гранулярной эндоплазматической сети является энергозависимым процессом, обеспечиваемым белком рибофорином. Поэтому дегрануляция цистерн гранулярной эндоплазматической сети свидетельствует о нарастающем энергодефиците. Дегенеративные изменения гранулярной эндоплазматической сети приводит к накоплению синтезированных белков в цитоплазме. Под воздействием развивающейся гипоксии и ацидоза нарастает их денатурация. Сморщивание гиперхромных нейронов является результатом потери воды из-за энергетических и ионных нарушений, которые обуславливают снижение размеров и деформацию перикарионов. Сморщенные нейроны утрачивают функциональную активность и в последующем фагоцитируются микроглией [5].

На фоне введения L-NAME нарушения более выраженными, что может быть опосредовано блокированием эндотелиальной NOS. Это согласуется с данными о снижении антигипоксической резистентности организма и активации оксидативных процессов [7-9].

При дополнительном введении L-Аргинина негативные изменения, вызванные L-NAME, корректировались. Эти эффекты L-Аргинина при церебральной ишемии могут быть связаны как с его непосредственным антиоксидантным и антигипоксическим влиянием, так и с непрямым действием, обусловленным образованием NO [6, 9].

## Заключение

Таким образом, введение неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME усугубляло гистологические нарушения нейронов теменной коры при субтотальной церебральной ишемии (происходило увеличение количества сморщенных нейронов, более выражена была деформация их перикарионов). Применение L-Аргинина оказывало корректирующее воздействие, обусловленное как его непосредственным антигипоксическим влиянием, так и опосредованным, за счет синтеза NO.

*Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект M18M-036).*

## Литература (references)

1. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие. – Минск.: Институт подготовки научных кадров Национальной Академии Наук Беларуси – 2008. – 235 с. [Batin N.V.

- Komp'yuternyy statisticheskiy analiz dannykh*. Computer statistical data analysis: proc. Method. allowance. – Minsk: Institute for the Training of Scientific Personnel of the National Academy of Sciences of Belarus, 2008. – 235 p. (in Russian)]
2. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Гистологические изменения в парietальной коре и гиппокампе крыс после субтотальной церебральной ишемии // Журнал ГрГМУ. – 2018. – N4. – С. 419-423. [Bon E.I., N.Ye. Maksimovich, S.M. Zimatkin. *Zhurnal GrGMU*. Journal of GrSMU. – 2018. – N4. – С. 419-423. (in Russian)]
  3. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Микроскопическая организация изокортекса крысы // Новости медико-биологических наук. – 2017. – №4. – С. 80-88. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of Biomedical Sciences. – 2017. – N4. – P.80-88. (in Russian)]
  4. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Морфологические представления о кровообращении головного мозга крысы // Вестник ВГМУ. – 2018. – N2. – С. 30-36. [Bon E.I., N.Ye. Maksimovich. *Vestnik VGMU*. Bulletin of VSMU. – 2018. – N2. – С. 30-36. (in Russian)]
  5. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга // Биомедицина. – 2018. – N2. – С. 59-71. [Bon E.I., N.Ye. Maksimovich. *Biomedicina*. Biomedicine. – 2018. – N2. – С. 59-71. (in Russian)]
  6. Максимович Н. Е. Агрегация тромбоцитов при модуляции пути L-Аргинин-NO у крыс с ишемией головного мозга // Патопфизиология и экспериментальная терапия. – 2005. – N4. – С. 14-15. [Maksimovich N.Ye. *Patofiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. Pathophysiology and experimental therapy. – 2005. – N4. – С. 14-15. (in Russian)]
  7. Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидергической системе мозга. Роль нейрональных источников // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2003. – N4. – С. 7-11. [Maksimovich N.Ye. *Zhurnal GrGMU*. Journal of GrSMU. – 2003. – N4. – С. 7-11. (in Russian)]
  8. Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидергической системе мозга. Роль экстранейрональных источников // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2004. – №1. – С. 3-5. [Maksimovich N.Ye. *Zhurnal GrGMU*. Journal of GrSMU. – 2004. – N1. – С. 3-5. (in Russian)]
  9. Максимович Н. Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга: монография. – Гродно, ГрГМУ, 2004. – 178 с. [Maksimovich, N. Ye. *Rol' oksida azota v patogeneze ishemicheskikh i reperfuzionnykh povrezhdeniy mozga*. The role of nitric oxide in the pathogenesis of ischemic and reperfusion brain damage: a monograph. - Grodno, GrSMU, 2004. – 178 p. (in Russian)]
  10. Смертность в Республике Беларусь: офиц. стат. сб. за 2016-2017 гг. – Минск: ГУ РНМБ, 2018. – 236 с. [*Smertnost' v Respublike Belarus*. Mortality in the Republic of Belarus: official stat. Sat for 2016-2017 - Minsk: GU RNMB, 2018. – 236 p. (in Russian)]
  11. Bon L.I., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M. Effects of experemental cerebral ishemia on metabolic characteristics of parietal cortex neurons // Bioprocess Engineering. – 2018. – N2(1). – P. 1-5.
  12. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes: text with EEA relevance 20.10.2010. – Strasbourg: Official Journal of the European Union, 2010. – 46 p.
  13. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. – Academic Press, Australia, 1998. – 242 p.
  14. Prado R. Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition effects on cerebral blood flow, pial artery diameter, and vascular morphology in rats // Stroke. – 1992. – V.23. – P. 1118-1124.

### Информация об авторах

**Бонь Елизавета Игоревна** – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru

**Зиматкин Сергей Михайлович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: smzimatkin@mail.ru

**Максимович Наталия Евгеньевна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by

**Валько Никита Андреевич** – студент УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: sumeresto@gmail.com

**Кот Виктория Николаевна** – студентка УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: vika\_kot\_1999@mail.ru

**Неделько Эдвард Александрович** – студент УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru